

MUTACION FUNDADORA EN UNA FAMILIA ARGENTINA CON  
CANCER COLORRECTAL HEREDITARIOLAURA GOMEZ<sup>1</sup>, JOSE ADI<sup>2</sup>, JORGE IBARRA<sup>2</sup>, MARIA ROQUE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Histología y Embriología (IHEM), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, CCT-Mendoza-CONICET; <sup>2</sup>Servicio de Gastroenterología, Hospital Lagomaggiore, Mendoza

**Resumen** El cáncer colorrectal hereditario no poliposo (CCHNP) se relaciona con mutaciones en los genes reparadores de ADN (MLH1, MSH2 y MSH6). La mayoría de estas alteraciones son familia-específicas y su detección suele requerir la secuenciación completa de los genes relacionados. Se detectó una mutación puntual (2269-2270insT) en el último codón del gen MLH1 en familias de un área del norte de Italia (Reggio Emilia) y su origen se considera debido a un efecto fundador. En este trabajo presentamos una familia mendocina con CCHNP portadora de la misma mutación, cuyos ancestros eran oriundos de Reggio Emilia. Para la detección de la mutación se diseñó una estrategia basada en PCR y posterior corte enzimático. La mutación fue hallada en tres integrantes de la familia estudiada, dos de los cuales no presentaban sintomatología clínica. Estos pacientes fueron seguidos preventivamente mediante colonoscopias. La metodología utilizada en nuestro laboratorio fue específica y sensible para la detección de una mutación previamente registrada y permitió realizar el diagnóstico genético molecular en el país, evitando el envío de muestras al extranjero. Es de importancia destacar que el diagnóstico genético pre-sintomático de cáncer hereditario, enfocado desde un grupo multidisciplinario de profesionales, permite un mejor seguimiento y apoyo a las familias afectadas.

**Palabras clave:** cáncer de colon, mutación fundadora, diagnóstico pre-sintomático

**Abstract** *Detection of a founder mutation in an Argentine family with hereditary non polyposis colorectal cancer.* Hereditary non polyposis colorectal cancer (HNPCC) has been related to mutations in the DNA mismatch repair genes (MLH1, MSH2 y MSH6). Mutation detection analysis requires the complete sequencing of these genes, given the high frequency of family-specific alterations. A point mutation (2269-2270insT) in the last codon of the MLH1 gene has been detected in families from a northern region of Italy (Reggio Emilia). Given that this alteration was registered only in people from this region, it has been considered a founder mutation. In this work, we present an Argentine HNPCC family whose ancestors were natives from the Reggio Emilia, Italy, and who were carriers for this mutation. In order to detect the genetic alteration, a PCR was developed followed by a restriction enzyme incubation assay. The mutation was detected in 3 family members, two of them without clinical symptoms. The PCR/restriction enzyme methodology has been sensitive and specific for the detection of this mutation. It has allowed the performance of a pre-symptomatic genetic diagnosis in the Argentine HNPCC family, avoiding sending samples abroad. It is worth mentioning that pre-symptomatic diagnosis of hereditary cancers allows enhanced surveillance and support for the affected families when it is performed by a multidisciplinary group.

**Key words:** colon cancer, founder mutation, pre-symptomatic diagnosis

De todos los cánceres, la incidencia del cáncer colorrectal (CCR) se encuentra en segundo lugar entre las mujeres y en tercer lugar entre los hombres, afectando a 1:200-1:2000 personas en la población occidental<sup>1,2</sup>.

Dentro de las formas hereditarias del CCR, el tipo no poliposo (CCHNP) es la forma más frecuente y se relaciona con alteraciones genéticas en los genes reparadores de ADN (genes *MMR* del inglés: mismatch repair). El síndrome presenta un patrón de herencia autosómico dominante con alta penetrancia, y sus rasgos preponderantes son la temprana edad de manifestación clínica (<50 años), la localización proximal de los tumores colónicos y un alto riesgo a desarrollar tumores colorrectales primarios múltiples y tumores extracolónicos<sup>3</sup>.

Los primeros criterios clínicos para el diagnóstico de CCHNP (criterio de Amsterdam I) fueron establecidos en 1990 y luego fueron mejorados mediante el criterio de

Recibido: 8-I-2009

Aceptado: 3-VI-2009

**Dirección postal:** Dra. María Roqué, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Histología y Embriología (IHEM), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, CCT-Mendoza-CONICET, Parque General San Martín S/N, 5500 Mendoza, Argentina  
Fax: (0054 261) 449 4117 e-mail: mroque@fcm.uncu.edu.ar



establecimiento de una nueva población a partir de pocos individuos. Esto ocurre cuando una población pequeña se separa de otra original más grande.

En este trabajo presentamos el caso de una familia argentina con CCHNP portadora de la mutación 2269-2270insT cuyos ancestros eran oriundos de Reggio Emilia de Italia.

El motivo de inclusión a nuestro estudio fue que la familia contaba con la información de un análisis genético previo (del año 2002) realizado a un pariente de tercer grado que vivía en el extranjero (EE.UU.). Según el informe genético, este pariente era portador de la mutación 2269-2270insT en MLH1 con "carácter patológico desconocido". Un análisis de la literatura nos reveló el hallazgo del grupo de investigadores italianos sobre la existencia de correlación entre la mutación 2269-2270insT y el desarrollo de CCHNP<sup>15</sup>. A su vez, los investigadores sugerían un origen fundador de la mutación en la misma región de la cual era oriunda la familia mendocina.

Basados en la información recolectada, nuestro objetivo fue detectar la mutación fundadora en los parientes argentinos.

## Materiales y métodos

Tres integrantes de la familia mendocina ingresaron a nuestro estudio: el padre (69 años), que había tenido CCR 17 años

atrás y de cuyo tumor nuestro grupo carecía por ende de datos histopatológicos, una hija mujer (31 años) y un hijo varón (33 años) que no presentaban sintomatología.

Luego de obtener el consentimiento de los pacientes para participar en el estudio, se obtuvo ADN genómico a partir de sangre entera con EDTA.

En nuestro laboratorio se desarrolló una estrategia basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior corte enzimático para detectar indirectamente la mutación 2269-2270insT, basados en la metodología publicada por un grupo italiano<sup>15</sup>. Para la puesta a punto de la estrategia se utilizó una muestra de ADN de un habitante de Reggio Emilia portador de la mutación (gentileza de los Dres Fiorella Gurrieri y Emanuela Lucci Cordisco, del *Istituto di Genetica Medica, Università Cattolica S. Cuore*, Italia).

La PCR se efectuó utilizando los siguientes cebadores para amplificar el exón 19: uno para el extremo 5' (GACA-CCAGTGTATGTTGG) ubicado en el intrón 19, y otro para el extremo 3' (GAGAAAGAAGAACACATCC) localizado en la región 39 no traducida. Para ambos pares de cebadores se comenzó con una incubación de 3 minutos a 94 °C, seguido de 3 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 53 °C y 30 segundos a 72 °C; 27 ciclos posteriores de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 62 °C y 30 segundos a 72 °C; y un paso de extensión final de 3 minutos a 72 °C. Para la digestión enzimática 5 µl de producto de PCR fueron incubados con 11 µl de agua miliQ, 2 µl de buffer Tango (33 mM Tris-acetato pH 7.9, 10 mM acetato de Mg, 66 mM de acetato de K, 0.1 mg/ml de BSA, *Fermentas Life Sciences*) y 6 µl de la enzima de restricción Dra I (*Fermentas Life Sciences*) a 37 °C 16 h. Los productos obtenidos se resolvieron en geles de poliacrilamida no desnaturalizante al 10% a 120 V, durante 1 hora.

La mutación a detectar genera un sitio de corte para la enzima de restricción DraI. De esta manera, al incubar el pro-

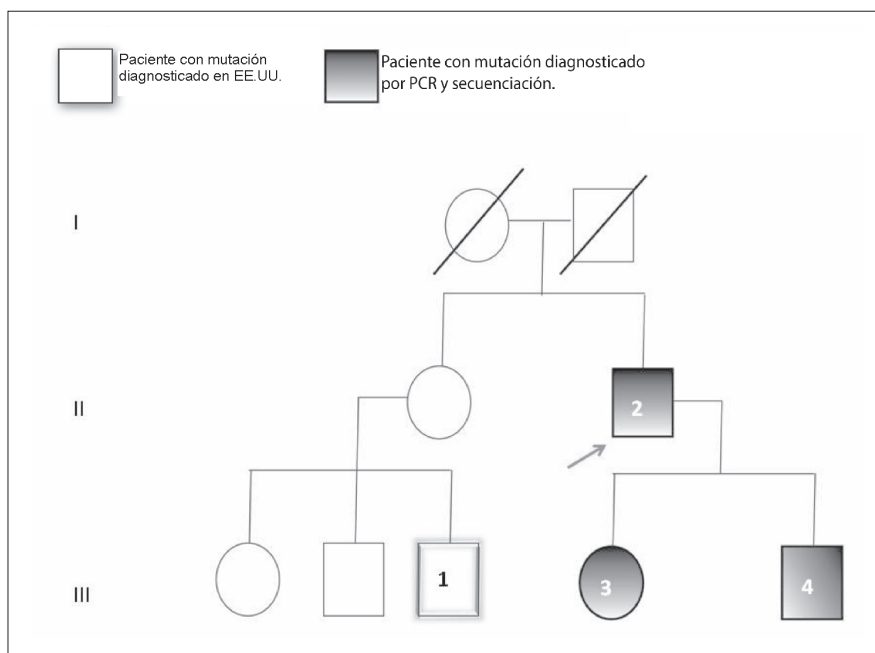


Fig. 2.- Pedigree de la familia CCHNP. El paciente III1 contaba con un estudio genético previo a este trabajo, que informaba su estado de portador para la mutación en el gen MLH1. Los pacientes II2, III3 y III4 fueron diagnosticados por PCR/corte enzimático y secuenciación en nuestro laboratorio. La flecha indica al paciente II2 que tuvo CCR 17 años antes de análisis genético.

ducto obtenido por PCR con la enzima Dral, el alelo mutado es cortado en dos fragmentos: uno de 225 pb y otro de 43 pb. En el alelo sano en cambio, no se encuentra este sitio de corte y al ser incubado con la enzima Dral el fragmento mantiene su tamaño intacto de 268 pb. De esta manera el alelo sano es distinguible del alelo mutado por la diferencia de tamaños de los fragmentos de PCR.

Una vez puesta a punto la estrategia en el ADN utilizado como control positivo, se extendió el estudio a los 3 integrantes de la familia mendocina afectada.

Para confirmar los resultados indirectos de la estrategia basada en PCR y corte enzimático, se analizaron las muestras por secuenciación directa. Para esto, los productos de PCR sin incubación enzimática fueron separados por electroforesis y posteriormente purificados a partir de un gel de agarosa. Se realizó la reacción de secuenciación en nuestro laboratorio con ambos cebadores (extremo 5' y extremo 3') y los productos fueron resueltos en un secuenciador automático ABI3130 de la Universidad Nacional de Cuyo. El programa utilizado para el análisis de los electroferogramas fue *Sequencing Analysis v5.2*.

## Resultados

Después de poner a punto la estrategia de PCR y corte enzimático en el ADN utilizado control positivo, se realizó el estudio en los 3 integrantes de la familia mendocina incluida en este estudio. La mutación fue detectada en el padre de la familia (Fig 2, II2) de 69 años, que había tenido CCR a los 52 años con una posterior recidiva local. El estudio reveló además que ambos hijos (Fig 2, III3 de 31 años y III4 de 33 años) que no presentaban sintomatología clínica a la fecha, eran portadores de la misma mutación.

Como se puede observar en la Fig. 3, el control sano presenta luego de la incubación enzimática (calles +) un fragmento de PCR del mismo tamaño que sin la incubación enzimática (calles -). Esto revela que ambos alelos sanos del individuo control no son cortados por la enzima Dral. En los tres integrantes de la familia en estudio (II2, III3 y III4) se observan dos fragmentos de PCR en las calles +: un fragmento superior (268 pb) no cortado –que corresponde al alelo sano– y un fragmento inferior de menor tamaño (225 pb), que corresponde al alelo mutado. El tercer fragmento de 43 pb no es visible en el gel. Este resultado revela que los 3 integrantes de la familia eran portadores de la mutación.

Los resultados fueron confirmados por secuenciación directa (Fig. 3).

## Discusión

Frente a la ausencia de diagnóstico genético para CCR hereditario en la provincia de Mendoza, nuestro grupo trabajó sobre la conformación de un equipo multidisciplinario de profesionales para la detección y el seguimiento preventivo de esta enfermedad. A pesar de las

dificultades para establecer líneas de trabajo multidisciplinarias en el área de salud humana, se logró conformar un equipo integrado por biólogos moleculares, un gastroenterólogo, un cirujano y un oncólogo. Se tomaron como base de acción los lineamientos establecidos por las normativas internacionales como también por el Consenso Argentino de Prevención del Cáncer Colorrectal (2004)<sup>22</sup>. Se elaboró un protocolo de trabajo, dividiendo las funciones en Área diagnóstica integrada por los biólogos y Área de evaluación, prevención y seguimiento, integrada por el resto de los profesionales. Esta conformación multidisciplinaria favoreció la incorporación al estudio de familias con CCR hereditario y su integración a un protocolo de diagnóstico y seguimiento, como es el caso de la familia reportada en este trabajo.

La detección precoz brinda una mayor posibilidad de tratamiento pues permite una intervención terapéutica eficaz en la mayoría de los casos<sup>23</sup>. Una vez realizado el diagnóstico genético a la familia incluida en este estudio, se les recomendó a los dos pacientes asintomáticos portadores de la mutación, realizarse una colonoscopia cada 2 años hasta los 70-75 años de edad. Debido a que el cáncer de endometrio es la manifestación extracolónica más frecuente en mujeres con CCHNP, se le recomendó a la mujer portadora de la mutación que se realizara estudios ginecológicos anuales. Los estudios de seguimiento realizados, no han revelado a la fecha la aparición de tumores en ninguno de los pacientes estudiados.

Cabe mencionar que el diagnóstico preventivo de cáncer hereditario enfocado desde un grupo multidisciplinario de profesionales permite un mejor seguimiento y apoyo a las familias afectadas.

La mutación detectada en esta familia es una mutación fundadora proveniente del norte de Italia, que afecta al codón de terminación natural de la proteína MLH1. Se sabe que el dominio C-terminal de la proteína MLH1 es requerido para su dimerización con PMS2 y para el reconocimiento del error en el ADN. Estudios previos revelan que la capacidad de dimerización de MLH1 es reducida en un 80% si su dominio C-terminal está afectado<sup>24</sup>. Otros datos confirman que la inhibición de la dimerización de MLH1-PMS2 está relacionada con el desarrollo de CCHNP<sup>25</sup>. Lo llamativo de la inserción T en medio del codón de terminación natural de la proteína es que su carácter patológico era difícil de establecer *a priori*. La proteína alterada está intacta hasta el último aminoácido, adquiriendo la adición de 32 aminoácidos en su extremo C-terminal. Su clara asociación al desarrollo de CCHNP revelada por los estudios italianos en Reggio Emilia permitió establecer su contribución al proceso tumoral.

La metodología utilizada en nuestro laboratorio fue específica y sensible para la detección de una mutación fundadora previamente registrada, y permitió realizar el

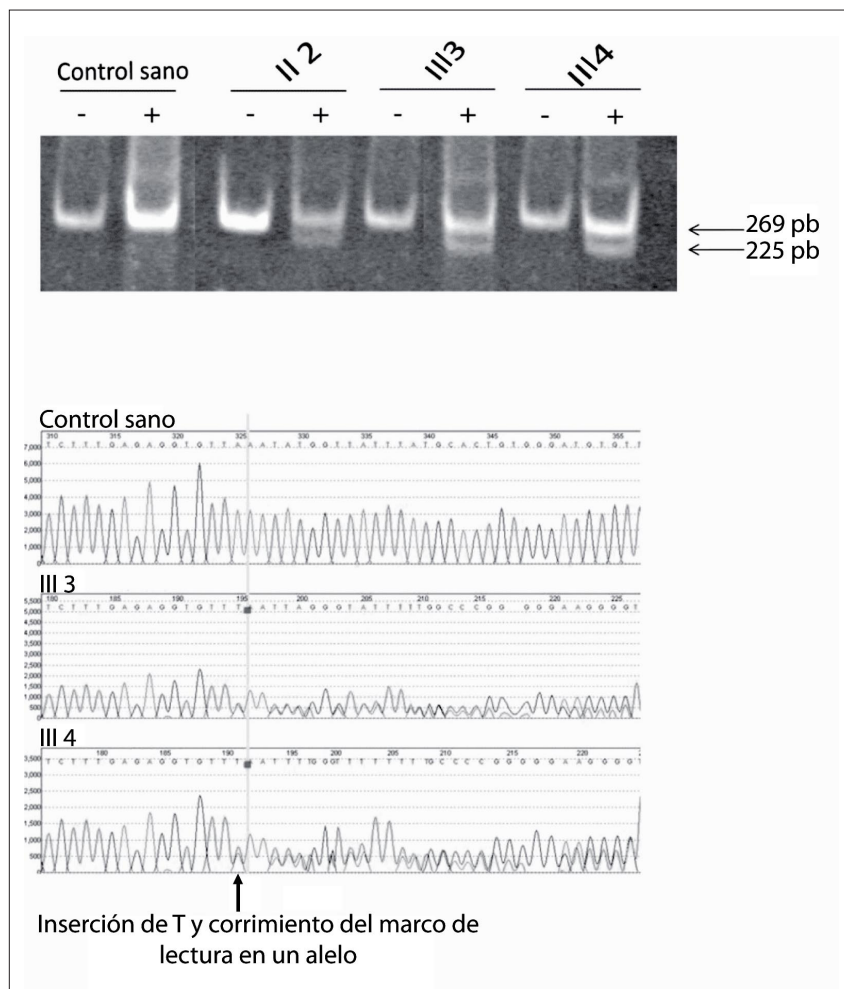


Fig. 3.— Detección indirecta y directa de la mutación 2269-2270insT. En el panel superior se presentan los resultados de la estrategia basada en PCR/corte enzimático resueltos por electroforesis en un gel de agarosa. Las calles (-) presentan el producto de PCR sin incubación enzimática. Las calles (+) presentan los mismos productos posteriormente incubados con la enzima DraI. Obsérvese que en el control sano no se detecta cambio en la altura de las bandas de 268pb, tanto en las calles (-) y (+). En cambio, en los pacientes II2, III3 y III4, las calles (+) presentan dos bandas. La banda superior (268 pb) corresponde al alelo sano, la inferior (225 pb) revela la presencia del alelo mutado. El tercer fragmento de 43 pb (producto del corte de 268 pb en dos fragmentos de 225 pb y 43 pb) no se observa en estos geles. En el panel inferior, los resultados son confirmados por secuenciación directa. En los dos electroferogramas inferiores (pacientes III3 y III4) se observa una superposición de picos a partir de la flecha. Esto revela la inserción de una timina en uno de los alelos, mostrando a partir de esa posición un corrimiento del marco de lectura respecto del alelo sano.

diagnóstico genético molecular en el país evitando el envío de muestras a centros extranjeros.

**Conflictos de interés:** No existen conflictos financieros o personales que hayan influido inapropiadamente en este trabajo.

## Bibliografía

1. Tops C. Genetics Changes During Colorectal Oncogenesis. En: Presymptomatic DNA Diagnosis of Familial Adenomatous Polyposis. Tesis doctoral. Leiden 1996, p10.
2. Alberts DS, Lipkin M, Levin B. Genetic screening for colorectal cancer and intervention. *Int J Cancer* 1996; 20: 62-3.
3. Graham C, Noralane M, Papadopoulos N, Haile R, Young J. Conversion analysis for mutation detection in MLH1 and MSH2 in patients with colorectal cancer. *JAMA* 2005; 293: 799-809.
4. Mecklin JP, Svendsen LB, Vasen H. Review: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Scan J Gastroenterol* 1994; 29: 673-7.
5. Kaz AM, Brentnall TA. Genetic testing for colon cancer. *Nature Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 670-9. Review.
6. Umar A, Risinger J, Hawk E, Barret JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nature Rev* 2004; 4: 153-6.

7. Modrich P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem* 2006; 281: 30305-9.
8. Ramsoekh D, Van Leerdam ME, Wagner A, Kuipers EJ. Detection and management of hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 101-11.
9. Vasen HF. The Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 113-26.
10. Vogelstein B, Kinzler KW. The Genetic Basis of Human Cancer. In: Boland RC. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Ed McGraw-Hill Professional* 1998, p 333-47.
11. Lindor NM, Petersen GM, Hadley DW, et al. Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome. *JAMA* 2006; 296: 1507-17.
12. Mismatch Repair Genes Variant DataBase. En: <http://www.med.mun.ca/MMRvariants/links.aspx>; consultado el 28/04/09
13. Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, Campbell H. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 885-902. Review.
14. Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1020-27.
15. Caluseriu O, Di Gregorio C, Lucci-Cordisco E, et al. A founder MLH1 mutation in families from the districts of Modena and Reggio-Emilia in northern Italy with hereditary non-polyposis colorectal cancer associated with protein elongation and instability. *J Med Genet* 2004; 41: e34.
16. Ponz de Leon MP, Benatti P, Di Gregorio C, et al. Genotype-phenotype correlations in individuals with a founder mutation in the MLH1 gene and hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 746-53.
17. de la Chapelle A, Wright FA. Linkage disequilibrium mapping in isolated populations: the example of Finland revisited. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12416-23.
18. Moisio AL, Sistonen P, Weissenbach J, de la Chapelle A, Peltomaki P. Age and origin of two common MLH1 mutations predisposing to hereditary colon cancer. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 1243-51.
19. Chan TL, Yuen ST, Ho JW, et al. A novel germline 1.8-kb deletion of hMLH1 mimicking alternative splicing: a founder mutation in the Chinese population. *Oncogene* 2001; 20: 2976-81.
20. Hutter P, Couturier A, Scott RJ, et al. Complex genetic predisposition to cancer in an extended HNPCC family with an ancestral hMLH1 mutation. *J Med Genet* 1996; 33: 636-40.
21. Menko FH, Wijnen JT, Vasen HF, Sijmons RH, Khan M. Familial and hereditary nonpolyposis of colorectal cancer: issues relevant for surgical practice. *Cancer Res* 1998; 146:20-31.
22. Ministerio de Salud y Ambiente, Academia Nacional de Medicina. Guía de recomendaciones para la prevención del cáncer colorrectal. Consenso Argentino, Buenos Aires, 2004. En: [http://www.sacp.org.ar/consenso\\_argentino\\_2004.pdf](http://www.sacp.org.ar/consenso_argentino_2004.pdf); consultado 5/1/2009.
23. Desai MK, Barkel D. Syndromic Colon Cancer: Lynch syndrome and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterol Clin N Am* 2008; 37: 47-72.
24. Guerrette S, Acharya S, Fishel R. The interaction of the human MutL homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *J Biol Chem* 1999; 274: 6336-41.
25. Wu X, Platt J, Cascalho M. Dimerization of MLH1 and PMS2 Limits Nuclear Localization of MutLa. *Mol Cell Biol* 2003; 9: 3320-8.

-----

141. No escucharse. Poco aprovecha agradarse a sí, si no contenta a los demás, y de ordinario castiga el desprecio común la satisfacción particular; débese a todos el que se paga de sí mismo, querer hablar, y oírse, no sale bien; y si hablarse a solas, es locura escucharse delante de otros, será doblada. Achaque de señor es hablar con el bordón, del digo algo, y aquel, es que aporrea a los que escuchan; a cada razón orejean la aprobación, o la lisonja, apurando la cordura. También los hinchados hablan con Eco, y como su conversación va en chapines de entono, a cada palabra solicita el enfadoso socorro del necio, bien dicho.

[Baltasar] Lorenzo Gracián (1601-1658)

*Oráculo Manual y Arte de Prudencia* (1647). Impresión facsimilar de la edición príncipe (Huesca), por Jorge M. Furt. Buenos Aires: Coni, 1958. Con ligeras modificaciones de la ortografía.